

## OPTIMASI TEKNIK ISOLASI DAN PURIFIKASI DNA PADA DAUN CABAI RAWIT (*Capsicum frutescens* cv. Cakra Hijau) MENGGUNAKAN GENOMIC DNA MINI KIT (PLANT) GENE AID

### *Optimization Of Dna Isolation And Purification Technique From Chili Pepper (Capsicum Frutescens Cv. Cakra Hijau) Using Genomic DNA Mini Kit (Plant) Geneaid*

Septi Kurniama Sari, Muthia Naila Mazieda, Dwi Listyorini, dan Eko Sri Sulasmi

Biology Department, Faculty of Mathematics and Natural Science,  
State University of Malang

E-mail: septi.tzarosemary@gmail.com

**Abstract** - Chili pepper (*Capsicum frutescens* L.) is one cultivar of *Capsicum* genus with spicy flavor as the main character. Capsaicin was identified responsible as a constituent properties on the chili pepper. Capsaicin compound to be known used for analgesic, antimicrobial and even anti-cancer as well. There are many techniques can be used to isolate DNA, but every plant needs some specific techniques. Plants produce secondary metabolites characteristic and thus require proper protocol to obtain DNA with optimum quality and quantity. This study aims to find specific optimization techniques to isolate pure DNA with a high concentration of *Capsicum frutescens* cv. Cakra Hijau. Various kits have been available for the isolation and purification of DNA. Optimization is done based on the protocol of a DNA isolation kit, Genomic DNA Mini Kit (Plant) Geneaid. Optimization results using samples stored for longer (*over night*), the incubation time addition, and centrifugation speed modification showed DNA concentration was 194.7 ng/mL with a purity of 1.82.

**Keywords:** *Capsicum frutescens* cv. cakra hijau, optimization, isolation, DNA

#### PENDAHULUAN

Cabai rawit (*Capsicum frutescens* cv. Cakra Hijau) merupakan salah satu spesies yang banyak dibudidayakan dan dimanfaatkan di Indonesia. Rasa pedas merupakan sifat khas yang dimiliki oleh genus *Capsicum*. Rasa pedas cabai adalah hasil akumulasi alkaloid kapsaisin beserta analognya (Stewart, *et. al.*, 2005). Kapsaisin pada dasarnya berfungsi untuk menghalangi pemangsa. Dalam dunia kedokteran kapsaisin juga bermanfaat untuk anti arthritis, analgesik, antioksidan dan sebagai agen anti kanker. Nwoken, *et. al.*, (2010) menambahkan bahwa kandungan kapsaisin memiliki efek melawan kolesterol dan obesitas. Gen *Pun1* adalah gen yang dikenal memiliki efek signifikan terhadap tingkat kapsaisin (Hernandez, *et. al.*, 2013). *Pun1* berperan penting dalam regulasi jalur sintesis kapsaisin (Reddy, *et. al.*, 2014). Mengingat banyak manfaat yang dimiliki oleh capsaicin, lebih lanjut perlu diketahui susunan genotipe melalui analisis molekuler

untuk lebih memahami regulasi gen pada genus *Capsicum*.

Analisis molekuler tumbuhan tergantung pada jumlah dan kemurnian sampel DNA (Pharmawati, 2009). Kehadiran metabolit sekunder pada tanaman tinggi terkadang menghambat proses isolasi dan menyebabkan munculnya kontaminasi pada DNA murni. DNA yang baik secara kualitas dalam arti kemurnian DNA maupun kuantitas (konsentrasi DNA) dalam proses isolasi merupakan tahap awal yang sangat penting dan harus terpenuhi dalam studi molekuler. Eksplorasi potensi genetik pada tanaman *Capsicum frutescens* cv. Cakra Hijau ini dapat mendukung program pemuliaan dan konservasi. Perkembangan bioteknologi melalui teknik molekuler akan lebih memudahkan proses tersebut.

Organisme eukariot menyimpan DNA dalam inti sel. Secara garis besar, isolasi DNA perlu melalui beberapa tahap yaitu melisis dinding sel dan membran sel untuk mengeluarkan isi sel, melisis protein



membran, protein sitoplasmik serta nukleolar dan terakhir adalah proses presipitasi DNA untuk memisahkan DNA dari senyawa lain. Teknik isolasi dan purifikasi molekuler tersebut sangat bervariasi. Faktor-faktor penentu yang mempengaruhi pelaksanaan kerja molekuler diantaranya adalah faktor biaya yang relatif lebih mahal dan pengadaan bahan yang terkadang memerlukan waktu lama sehingga menjadi penghambat kegiatan di laboratorium (Syafaruddin dan Santoso, 2011). Untuk itu diperlukan solusi untuk mengatasi permasalahan tersebut.

Penggunaan kit dalam studi molekuler dapat meningkatkan efektifitas dan efisiensi kerja. Penggunaan teknik isolasi DNA menggunakan kit maupun manual memiliki kelebihan dan kekurangan. Metode konvensional memiliki kelebihan harga lebih murah dan dapat digunakan dalam lingkup luas, sementara kekurangannya membutuhkan waktu yang relatif lama dan hasil yang diperoleh tergantung jenis sampel. Persiapan alat dan bahan ekstraksi manual pada umumnya membutuhkan waktu relatif lebih lama. Nalini, et. al., (2003) menambahkan bahwa protokol isolasi telah banyak tersedia, namun umumnya protokol tersebut cukup rumit dan memakan waktu relatif lama. Dalam satu paket kit telah tersedia seperangkat perlengkapan isolasi yang siap pakai, sehingga meminimalisir waktu kerja. Modifikasi protokol standar dilakukan untuk menemukan teknik isolasi dan purifikasi yang tepat untuk meningkatkan efektifitas kerja. Penelitian bertujuan untuk menemukan teknik yang efektif dalam proses isolasi dan purifikasi DNA *Capsicum frutescens* cv. Cakra Hijau melalui beberapa perlakuan. Hasil penelitian diharapkan dapat digunakan sebagai referensi untuk penelitian selanjutnya.

## METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan di laboratorium bioteknologi Universitas Negeri Malang pada bulan Maret sampai April 2014. Sampel yang digunakan adalah daun *Capsicum frutescens* cv. Cakra Hijau yang diperoleh dari Balai Pengkajian Teknologi Pertanian (BPTP) Karangploso, Malang. Alat yang digunakan dalam penelitian antara lain mortar pistil, *scapel*, cawan petri, spatula, pinset, neraca analitik, *micro tube*, mikro pipet, *vortex*, *centrifuge*, *waterbath*, lemari es, dan *Nano Drop spectrophotometer*. Bahan yang digunakan adalah nitrogen cair, SDW (*Single Distilled Water*), *Genomic DNA Mini Kit (Plant)* dari *Geneaid*, dan Proteinase-K.

Perlakuan dilakukan secara bertahap dimulai dari perlakuan menggunakan protokol standar kit sampai ditemukannya teknik yang tepat untuk mendapatkan konsentrasi DNA yang baik. Modifikasi teknik dilakukan setelah konsentrasi dan kemurnian DNA diketahui. Selanjutnya dilakukan pengulangan untuk teknik yang menghasilkan konsentrasi terbaik. Tahap utama isolasi yang dilakukan meliputi tahap persiapan sampel, disosiasi jaringan, tahap lisis jaringan, DNA binding, pencucian DNA, dan DNA elution. Pada tahap persiapan dilakukan sterilisasi daun *Capsicum frutescens* cv. Cakra Hijau melalui proses pencucian. 100 mg daun dihaluskan dengan penambahan Nitrogen cair untuk menghancurkan jaringan kasar, kemudian dimasukkan ke *micro tube*.

Tahap lisis dilakukan dengan mencampurkan 400 µl buffer *GP1* atau *GPX1* dan 5 µl RNase A untuk mendegradasi RNA kontaminan di *tube* lain, kemudian dihomogenkan dan dimasukkan *tube* sampel. Suspensi diinkubasi 60°C selama 15 menit dan divortex setiap 5 menit (pada waktu yang sama diinkubasi pula *Elution buffer*). Setelah inkubasi ditambahkan 100 µl buffer *GP2* lalu divortex dan diinkubasi dalam es



selama 3 menit. Sampel dimasukkan *filter column* yang telah dipasang *collection tube*, kemudian disentrifugasi 1000 x g selama 1 menit. *Filter column* dibuang dan supernatant pada *collection tube* dipindahkan ke dalam tube baru.

Pada tahap pengikatan DNA, sampel ditambah GP3 sebanyak 1,5 volume sampel yang diperoleh dan divortex sampai homogen. 700 µl dari campuran dipindahkan ke dalam *GD column* yang telah dipasang *collection tube*, perlakuan diulangi jika masih ada sisa campuran pada tube. Sampel disentrifugasi 15.500 x g selama 2 menit. *Flow through* dibuang dan *GD column* dipasang kembali ke *collection tube*. Untuk proses pencucian, 400 µl buffer W1 dimasukkan ke *GD column*, kemudian disentrifugasi 15.000 x g selama 1 menit. *Flow through* dibuang dan *GD* dipasang lagi ke *collection tube*. Pencucian selanjutnya 600 µl *Wash Buffer* dimasukkan ke *GD column* dan disentrifugasi 15.000 x g selama 1 menit. *Flow through* dibuang dan, pasang lagi *GD column* ke *collection tube* lalu disentrifugasi 15.000 x g selama 3 menit untuk proses pengeringan.

Tahap akhir ekstraksi adalah tahap elusi DNA yang dilakukan 2 kali, dimana *GD column* dipindahkan ke dalam tube baru. Kemudian dimasukkan 50 µl Elution buffer (yang telah diinkubasi sebelumnya) tepat di tengah ring dan dibiarkan 5 menit, kemudian disentrifugasi 15.000 x g selama 1 menit. DNA hasil ekstraksi tersebut ditutup rapat dan *diparafilm* kemudian disimpan di lemari es.

DNA hasil isolasi diperiksa kemurnian dan konsentrasinya menggunakan *Nano Drop spectrophotometer*. Data yang diperoleh berupa rasio konsentrasi DNA (µl/ml) dan kemurnian dari setiap sampel. Hendra *et. al.*, (2009) menyebutkan bahwa tingkat kemurnian DNA berkorelasi dengan kualitas DNA. Panjang gelombang yang digunakan untuk pengukuran konsentrasi menggunakan spektrofotometer adalah 260 nm untuk DNA dan 280 nm untuk protein. DNA dinyatakan murni jika punya nilai rasio  $OD_{260/280}$  1,8-2,0 (Muladno, 2002). Rasio < 1,8 menunjukkan DNA terkontaminasi fenol atau protein hasil ekstraksi sedangkan rasio > 2,0 menunjukkan DNA yang terkontaminasi oleh RNA (Khosravinia *et. al.*, 2007).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Banyak teknik yang dapat digunakan untuk isolasi DNA. Teknik-teknik tersebut tergantung pada jenis tanaman dan sampel organ atau jaringan yang digunakan. Faktor penentu proses isolasi dan purifikasi DNA menurut Syafaruddin dan Santoso, (2011) diantaranya adalah: penghomogenan jaringan tanaman, komposisi dalam penambahan larutan buffer serta penghilangan enzim-enzim penghambat. Dalam penelitian, proses homogenisasi tanaman dengan buffer penting diperhatikan agar proses reaksi berjalan dengan baik. Hal tersebut dapat mempengaruhi konsentrasi dan kemurnian hasil isolasi. Prinsip dasar ekstraksi DNA adalah proses pemisahan DNA dari komponen lainnya, sehingga harus bebas kontaminasi (Tenriulo, *et. al.*, 2001)



Tabel 1. Hasil kuantifikasi Isolasi DNA *Capsicum frutescens* cv. Cakra Hijau berdasarkan perlakuan yang diberikan

Sample ID	Perlakuan	Konsentrasi DNA	260/280
Pun1 A	Standar protokol dengan GP1	26.5 ng/μl	1.79
Pun1 B	Standar protokol dengan GPX1	18.6 ng/μl	1.74
Pun1 C	GP1 + Pro-K	60 ng/μl	1.81
Pun1 D	GPX1 + Pro-K	55.4 ng/μl	1.83
Pun1 E	Daun segar + GP1 + Pro-K	69.9 ng/μl	1.89
Pun1 F	Daun segar + GPX1 + Pro-K	46.9 ng/μl	1.90
Pun1 G	Daun beku + GP1 + Pro-K	113.4 ng/μl	1.82
Pun1 H	Daun beku + GPX1 + Pro-K	41.1 ng/μl	1.85
Pun1 I	Daun beku + GP1 + Pro-K	194.7 ng/μl	1.82

Pada perlakuan sampel A dan B yang menggunakan protokol standar menunjukkan bahwa keduanya menghasilkan konsentrasi rendah (26,5 dan 18,6 ng/μl ) dengan kontaminasi protein (< 1.8). Perlakuan selanjutnya untuk mengatasi kontaminasi protein, masing-masing sampel kemudian ditambahkan 20 μl Protein-K tube *diinvert* lalu diinkubasi 60°C selama 10 menit. Penambahan Protein-K bertujuan untuk mereduksi metabolit tanaman berupa protein, perlakuan ini dilakukan pada tahap lisis setelah proses inkubasi RNase A. Penambahan Protein-K menghasilkan DNA murni, namun dengan konsentrasi yang masih rendah. Selanjutnya proses isolasi difokuskan untuk meningkatkan konsentrasi DNA.

Terdapat 2 pilihan buffer untuk proses lisis pada kit *Genaid*, yakni GP1 dan GPX1. GP1 diketahui merupakan buffer lisis untuk banyak spesies tanaman umum. Identifikasi menunjukkan pula bahwa buffer GPX1 merupakan buffer yang mengandung detergen yang efektif untuk melisiskan sampel tanaman yang mengandung banyak polisakarida. Fungsi GPX1 ini menyerupai CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) pada isolasi manual (Kusumawaty, 2007). Penelitian menunjukkan bahwa penggunaan GP1 memberikan konsentrasi DNA lebih tinggi dibandingkan GPX1 seperti yang tampak pada Tabel 1. Hasil ini menunjukkan bahwa

*Capsicum frutescens* L. tidak terlalu banyak mengandung metabolit sekunder berupa polisakarida.

Perlakuan sampel dalam proses isolasi diketahui mempengaruhi hasil DNA yang diperoleh. Bhattacharjee *et. al.*, (2004) menyatakan bahwa metode penyimpanan sampel sangat penting untuk diperhatikan. Secara kuantitatif diketahui bahwa sampel daun cabai yang telah dibekukan (*frozen leave*) memberikan konsentrasi DNA yang lebih besar dibandingkan dengan sampel daun segar (Tabel 1). Hasil tersebut senada dengan hasil penelitian Matasyoh *et. al.*, (2008) yang menunjukkan kualitas DNA ekstraksi lebih baik pada sampel beku. Pembekuan jaringan berperan untuk menghindari degradasi DNA.

Konsentrasi DNA yang rendah dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, yakni; disosiasi jaringan dan presipitasi DNA dari jaringan sel yang kurang maksimal sehingga menyebabkan ekstraksi DNA dari dalam sel hanya sedikit. Selain itu juga dapat disebabkan oleh pengikatan DNA yang kurang maksimal saat tahap binding DNA.

Sampel E-I diberikan perlakuan dengan waktu inkubasi dan perubahan teknik homogenisasi saat proses isolasi. Penambahan waktu indkubasi dilakukan dengan harapan agar enzim-enzim dapat bekerja dengan maksimal mendegradasi senyawa kontaminan. Waktu inkubasi RNase



A pada tahap lisis ditingkatkan menjadi 15 menit pada suhu 60°C dengan homogenisasi setiap 5 menit sekali. Homogenisasi suspensi yang sebelumnya hanya dilakukan dengan dibolak-balik, dirubah dengan cara *mixing* menggunakan vortex. Penambahan waktu inkubasi tersebut menunjukkan konsentrasi DNA yang semakin meningkat, yakni 69,9, 113,4, dan 194,7 µl/ml. hal tersebut dimungkinkan pengaruh dari proses homogenisasi suspensi sehingga kerja enzim lebih optimal. Langga, *et. al.*, (2012) menyatakan bahwa suhu berpengaruh nyata nyata terhadap konsentrasi DNA, sedangkan lama inkubasi tidak berpengaruh nyata. Sepertihalnya Langga, *et. al.*, (2012), konsentrasi DNA tinggi diperoleh pada perlakuan inkubasi 60°C.

#### SIMPULAN, SARAN, DAN REKOMENDASI

Permasalahan dalam proses isolasi DNA merupakan hal penting yang perlu diatasi dengan menganalisis penyebab dasarnya. Modifikasi protokol standar dalam proses isolasi DNA dilakukan untuk mendapatkan yield DNA yang optimal. Pada *Capsicum frutescens* cv. Cakra Hijau, kualitas DNA tertinggi diperoleh dari isolasi dengan perlakuan menggunakan buffer lisis GP1 dan sampel daun beku. Penyimpanan pada kondisi beku menghasilkan yield DNA lebih tinggi dengan kemurnian lebih baik daripada menggunakan daun segar. Suhu inkubasi 60°C dan penambahan waktu inkubasi menghasilkan konsentrasi DNA yang tinggi.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Bhattacharjee, R., Kolesnikova-Allen, M., Aikpokpodion, P., Taiwo, S., Ingebrecht I. 2004. An improved Semiautomated Rapid Method of Extracting Genomic DNA for Molecular Marker Analysis in Cocoa, *Theobroma cacao* L. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 22: 435a-435h
- Hendra, Suryaningtyas, Y. W. N., Riyanto, C., dan Heryanto, F. A. 2009. Ekstraksi DNA *Collocalia fuchiphoga* dengan metode *Phenol Chloroform Extraction* dari berbagai material sumber genetik.
- Hernandez-Garcia, C., Zhang, Z. 2013. The genetics of pepper heat: Significant genes identified in capsaicinoid biosynthesis. *Extension, Plant breeding and Genomic*.
- Khosravinia, H., H. N. N. Murthy, D. T. Prasad, & N. Pirany. 2007. Optimizing Factors Influencing DNA extraction from fresh whole avian blood. *African Journal of Biotechnology*. 6 (4): 481-486.
- Kusumawaty, D. 2007. Isolasi DNA skala kecil (buah, daging, darah, bakteri). Biologi UPI.
- Langga, F. I., Restu, M., dan Kuswinanti, T. 2012. Optimalisasi suhu dan lama inkubasi dalam ekstraksi DNA tanaman Bitti (*Vitex cofassus Reinw*) serta analisis keragaman genetic dengan teknik RAPD-PCR. *J. Sains & Teknologi*, 12 (3): 265-276
- Muladno. 2002 *Seputar Teknologi Rekayasa Genetika*. Pustaka Wirausaha Muda. Bogor.
- Matasyoh, G. L., Wachira, N. F., Kinyua, G. M., Thairu Muigai, W. A., and Mukiyama, K. T. 2008. Leaf storage conditions and genomic DNA isolation efficiency in *Ocimum gratissimum* L. from Kenya. *African Journal of Biotechnology*, 7 (5): 557-564.
- Nalini, E., Jawali, N., and Bhagwat, S. G. 2003. A simple method for isolation of DNA from plants suitable for long term storage and DNA marker analysis. *BARC Newsletter*, 249: 208-214.
- Nwoken, O. C., Agbaji, B. E., Kagbu, A. J., and Ekanem, J. E. 2010. Determination of Capsaicin Content and Pungency Level of Five Different Peppers Grown in Nigeria. *New York Science Journal*, 3 (9): 17-21.
- Pharmawati, M. 2009. Optimalisasi ekstraksi DNA dan PCR-RAPD pada *Grevillea spp.* (Proteaceae). *Jurnal Biologi XIII*, 1: 12-16
- Reddy, U. K., Almeida, A., Abburu, L. V., Alaparthy, B. S., Unselt, D., Hankins, G., Park, M., Choi, D., Nimmakayala, P. 2014. Identification of gene-specific polymorphisms and association with Capsaicin pathway metabolites in *Capsicum annum* L. collections. *Plos One*, 9 (1): 1-10.
- Stewart, C., Kang, B., Liu, K., Mazourek, M., Moore, L. S., Yoo, Y. 2005. The *Pun 1* gene for pungency in pepper encodes a putative acyltransferase. *The Plant Journal* 42 : 675-688.
- Syafaruddin dan Santoso, J. T. 2011. Optimasi teknik isolasi dan purifikasi DNA yang efisien dan efektif pada Kemiri Sunan (*Reutalis trisperma* (Blanco) Airy Shaw). *Jurnal Littri*. 17 (1): 11-17



Tenriulo, A., Suryati, E., Parenrengi, A., dan Rosmiat. 2001. Ekstraksi rumput laut *Kappaphycus alvarezii* dengan metode fenol kloroform. *Marina Chimica Acta*, 2 (2): 6-10

### TANYA JAWAB

Penanya : Evy Hanifah

Pertanyaan :

- a. Pengambilan daun cabai, adalah daun yang segar. Pada sampel daun yang keberapakah yang digunakan dalam penelitian anda?

Jawab :

- a. Daun yang digunakan dalam isolasi adalah daun ke 4 sampai ke 6 dari ujung. Daun yang terlalu muda tidak dipilih karena perkembangan daun muda belum optimal sehingga mempengaruhi hasil isolasi whole genome dan DNA total masih terlalu sedikit.

Penanya : Muh.Shofi

Pertanyaan :

- a. Optimasinya, mengapa memakai protokol kit yang beragam dan modifikasi?
- b. Tahunya terjadi kontaminasi dari apa?
- c. Apa modifikasinya?

Jawab :

- a. Pertama menggunakan kit MN tetapi karena kehabisan MN lalu berpindah ke kit Geneaid yang harganya juga lebih murah. Modifikasi dilakukan karena metabolit sekunder pada tumbuhan yang beragam. Masing-masing kit memiliki reagen yang berbeda-beda sehingga untuk setiap merk kit yang digunakan membutuhkan optimasi teknik isolasi sesuai dengan sampel yang akan diekstrak.
- b. Dengan modifikasi bertahap, bila masih ditemukan kontaminasi protein maka ditambahkan enzim degradasi protein (proteinase) untuk menghilangkannya.
- c. Modifikasi ditentukan berdasarkan hasil pengukuran kualitas dan kuantitas DNA. Dari hasil pengukuran tersebut akan dapat ditentukan reagen/enzim apa yang harus ditambahkan agar hasil isolasi lebih optimal.

